PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : C07C 229/18, C12Q 1/44 — A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 95/32181**

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 30. November 1995 (30.11.95)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP95/01919

(22) Internationales Anmeldedatum: 19. Mai 1995 (19.05.95)

(30) Prioritätsdaten:
A 1029/94 19. Mai 1994 (19.05.94) AT

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: PROGEN BIOTECHNIK GMBH [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 519, D-69120 Heidelberg (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: HERMETTER, Albin [AT/AT]; Sandgasse 23, A-8010 Graz (AT). DUQUE, Martin [AT/AT]; Michael-Kienreichstrasse 3, A-8053 Graz (AT). PALTAUF, Fritz [AT/AT]; St. Peter Hpstrasse 29b/III, A-8042 Graz (AT).

(74) Anwalt: DEUFEL, Paul; Müller-Boré & Partner, Grafinger Strasse 2, D-81671 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.

(54) Title: FLUORESCENCE DETERMINATION OF THE ACTIVITY OF LIPOLYTIC ENZYMES

(54) Bezeichnung: FLUORESZENZBESTIMMUNG DER AKTIVITÄT LIPOLYTISCHER ENZYME

(57) Abstract

A fluorometric method was developed to determine the activity of lipases of animal, vegetable and microbial origin, in particular of lipases detectable in serum. For that purpose, fluorescent triglyceride analogues were synthesised in which an acyl or alkyl chain bears a fluorophore at the ω-end and another acyl or alkyl chain bears a fluorescence quencher. The fluorescent lipid is solubilised with amphiphiles in the form of liposomes, vesicles, micelles or emulsions in order to determine lipase activity. The fluorescent substrate may also be dissolved as such in an aqueous medium or be dissolved in organic solvents to be presented to the enzyme. The invention for the first time describes complexes of fluorescent triglycerides with appropriate proteins (for example albumin) in an aqueous medium as new substrate solubilisation forms for lipase analysis. The activity of lipolytic enzymes is determined through hydrolysis of the fluorescent substrate that results in a continuous increase in fluorescence intensity.

(57) Zusammenfassung

Zur Bestimmung der Aktivität von Lipasen tierischer, pflanzlicher und mikrobieller Herkunft sowie insbesondere im Serum detektierbarer Lipasen wurde eine Methode auf fluorimetrischer Basis entwickelt. Zu diesem Zweck wurden fluorogene Triglyceridanaloge synthetisiert, in denen eine Acyl- oder Alkylkette am ω-Ende einen Fluorophor und eine andere einen Fluoreszenzquencher trägt. Für die Aktivitätsbestimmung wird das fluorogene Lipid mit Amphiphilen in Form von Liposomen, Vesikeln, Micellen oder Emulsionen solubilisiert. Das fluorogene Substrat kann auch als solches im wäßrigen Medium verteilt oder in organischen Lösungsmitteln gelöst dem Enzym angeboten werden. Als neue Solubilisierungsform für Substrate in der Lipaseanalytik werden Komplexe von fluorogenen Triglyceriden mit geeigneten Proteinen (z.B. Albumin) im wäßrigen Medium erstmals beschrieben. Die Aktivität der fettspaltenden Enzyme wird über die Hydrolyse des fluorogenen Substrates bestimmt, die mit einem kontinuierlichen Anstieg der Fluoreszenzintensität verbunden ist.

BNSDOCID: <WO___9532181A1_I_>

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

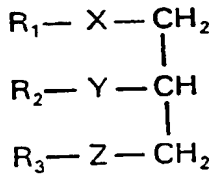
AT	Österreich	**GA**	Gabon	**MR**	Mauretanien
AU	Australien	**GB**	Vereinigtes Königreich	**MW**	Malawi
BB	Barbados	**GE**	Georgien	**NE**	Niger
BE	Belgien	**GN**	Guinea	**NL**	Niederlande
BF	Burkina Faso	**GR**	Griechenland	**NO**	Norwegen
BG	Bulgarien	**HU**	Ungarn	**NZ**	Neuseeland
BJ	Benin	**IE**	Irland	**PL**	Polen
BR	Brasilien	**IT**	Italien	**PT**	Portugal
BY	Belarus	**JP**	Japan	**RO**	Rumänien
CA	Kanada	**KE**	Kenya	**RU**	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	**KG**	Kirgisistan	**SD**	Sudan
CG	Kongo	**KP**	Demokratische Volksrepublik Korea	**SE**	Schweden
CH	Schweiz	**KR**	Republik Korea	**SI**	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	**KZ**	Kasachstan	**SK**	Slowakei
CM	Kamerun	**LI**	Liechtenstein	**SN**	Senegal
CN	China	**LK**	Sri Lanka	**TD**	Tschad
CS	Tschechoslowakei	**LU**	Luxemburg	**TG**	Togo
CZ	Tschechische Republik	**LV**	Lettland	**TJ**	Tadschikistan
DE	Deutschland	**MC**	Monaco	**TT**	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	**MD**	Republik Moldau	**UA**	Ukraine
ES	Spanien	**MG**	Madagaskar	**US**	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	**ML**	Mali	**UZ**	Usbekistan
FR	Frankreich	**MN**	Mongolei	**VN**	Vietnam

BNSDOCID: <WO___9532181A1_I_>

"Fluoreszenzbestimmung der Aktivität lipolytischer Enzyme"

Beschreibung

Zur Bestimmung der Aktivität von Lipasen tierischer, pflanzlicher und mikrobieller Herkunft (fungale und bakterielle Lipasen), sowie im Serum detektierbarer Lipasen [Lipoprotein-Lipase (LPL), hepatische Lipase (HL), Pankreaslipase (PL)] wurde eine Methode auf fluorimetrischer Basis entwickelt. Zu diesem Zweck wurden fluorogene Triglyceridanaloge synthetisiert, in denen eine Acyl- oder Alkylkette am ω-Ende einen Fluorophor und eine andere einen Fluoreszenzquencher trägt (siehe Formel I und II). Der dritte Substituent kann ein aliphatischer Kohlenwasserstoffrest sein. Für die Aktivitätsbestimmung wird das fluorogene Lipid mit Amphiphilen in Form von Liposomen, Vesikeln, Micellen oder Emulsionen solubilisiert. Das fluorogene Substrat kann auch als solches im wäßrigen Medium verteilt oder in organischen Lösungsmitteln gelöst dem Enzym angeboten werden. Als neue Solubilisierungsform für Substrate in der Lipaseanalytik werden Komplexe von fluorogenen Triglyceriden mit geeigneten Proteinen (z.B. Albumin) im wäßrigen Medium erstmals beschrieben. Die durch die fettspaltenden Enzyme induzierte Hydrolyse des fluorogenen Substrates führt zu einer räumlichen Trennung der Fluorophor- und Quencher-substituierten Kohlenwasserstoffkette und somit zu einem Fluoreszenzanstieg.



Formel I

Wesentlicher Bestandteil der Erfindung ist die Komplexierung der fluorogenen Lipide mit Albumin in wäßrigem Medium und darauffolgende Lyophilisierung, die ein festes "wasserlösliches" Substrat für die fluorimetrische Lipaseanalytik ergibt. Die vorgeschlagene Methode eignet sich für zahlreiche praktische Anwen-

BNSDOCID: <WO___9532181A1_I_>

dungen wie z.B. für die Lipaseanalytik in der medizinischen Diagnostik, der biotechnologischen Enzymproduktion, die Qualitätsüberprüfung von Lipasen, die in der organischen Chemie eingesetzt werden, den Nachweis von Lipasen oder Lipaseinhibitoren in Lebensmitteln, sowie das Enzymscreening von biologischem Material. Von den fluorogenen Lipiden wurden jeweils die Stereoisomeren hergestellt und in verschiedenen Substratformen (siehe oben) zur Lipasebestimmung eingesetzt. Verschiedene Lipasen zeigten stark unterschiedliche Stereospezifitäten an den fluorogenen Substraten. Das beschriebene Verfahren eignet sich daher für die Diskriminierung von Lipasen in natürlichen Enzymgemischen (z.B. Serum) als auch für das Screening (gentechnisch) modifizierter Enzyme.

Stand der Technik:

Folgende Methoden zur Bestimmung der Aktivität von Lipasen sind bekannt (Lipases, Borgström & Brockman, 1984):

1) radiometrische Verfahren (Clin. Chem. 30,748 (1984))
2) titrimetrische Verfahren (Methods in Enzymology, Vol. 71, 619-627 (1981))
3) spektroskopische Verfahren: a) photometrische
 b) fluorimetrische

ad1) Die radiometrischen Verfahren sind diskontinuierliche Verfahren, bei denen die Freisetzung radioaktiv markierter Fettsäuren aus einem Triglycerid nach erfolgter Abtrennung von der nicht umgesetzten Ausgangsverbindung bestimmt wird. Diese Methoden sind aufgrund der Verwendung von Radioaktivität und der schlechten Reproduzierbarkeit sehr aufwendig.

ad2) Die Freisetzung von Fettsäuren aus Triglyceriden wird mittels Laugentitration bestimmt. Für genaue Messungen müssen jedoch große Mengen an Enzym sowie an Substrat eingesetzt werden. Diese Methode ist sehr störanfällig. Im speziellen ist diese Methode bei bestimmten "Substratformen" nicht gut anwendbar, z.B. wenn das Substrat mit Detergentien solubilisiert ist oder in organischen Lösungsmitteln gelöst ist.

BNSDOCID: <WO___9532181A1_I_>

ad 3a) In diesem Fall wird die Bildung chromogener Carbonsäuren aus ihren (Glycerin-) Estern photometrisch (und fluorimetrisch) bestimmt (Boehringer Mannheim GmbH, Europäisches Patent 0207252B1). Die Empfindlichkeit dieser Methoden ist nicht sehr hoch, hingegen sind die fluorimetrischen Methoden empfindlicher und die Substrate vielfältiger.

ad 3b) Bekannte Fluoreszenzmethoden (siehe auch 3a) wurden auf folgenden Prinzipien basierend beschrieben (KSV-Chemicals, Oy Valimotie 7, Europäisches Patent 0037583B1). Tripyrenacyl-substituierte Triglyceride (Biochemica et Biophysica Acta, 963 (1988) 340-348) werden als Substrate geschildert, die intra- oder intermolekulare Excimerfluoreszenz in Gegenwart von Amphiphilen zeigen. Bei der hydrolytischen Spaltung einer Pyrenacylkette nimmt die Pyrenmonomerfluoreszenz auf Kosten der Excimerfluoreszenz zu. Ein zweites Konzept ist ähnlich aufgebaut. Ein markiertes Substrat enthält eine fluoreszierende Fettsäure (z.B. Pyrenbuttersäure), deren Fluoreszenz durch eine im Molekül benachbarte Quencherfettsäure unterdrückt wird (z.B. Bromhexansäure). Substratspaltung führt zu einer Entquenchung und somit zu einem Fluoreszenzanstieg. Beide Methoden funktionieren nur dann, wenn beide Fluorophore (Excimertechnik) oder Fluorophor und Quencher (Brom wirkt auf wenige Zehntel nm Distanz) eng benachbart sind. Wie im folgenden dargestellt, trifft dies in den meisten Fällen nicht zu. Bei der Third Conference on Methods and Applications of Fluorescence Spectroscopy in Prag/Tschechien vom 18. - 21.10.1993 ("Conformational effects on the fluorescence of pyrene-labeled alkyldiacyl glycerols in different model membranes", Peer reviewed articles, Plenum Press, in press) haben wir bereits berichtet, daß Di-pyrenacylglycerole "ungünstige" Konformationen in Micellen, Emulsionen, in Gegenwart von Albumin sowie in organischen Lösungsmitteln zeigen und nur in Vesikeln intramolekulare Excimer-Fluoreszenz ausbilden. Bei der Verwendung von Bromacyl-substituierten Pyrentriglyceriden in Micellen, Emulsionen, Albumin sowie in organischen Lösungsmitteln wird die erforderliche Nachbarschaft von Bromacyl und Pyrenacyl-Rest aus denselben Gründen auch nicht erreicht und der gewünschte Quencheffekt nicht erzielt. Die bisher bekannten Substrate können allenfalls in Vesikeln zur Aktivitätsbestimmung von angereicherten und reinen Enzymen verwendet werden. Bei Serum-

BNSDOCID: <WO___9532181A1_I_>

analysen kommt es hingegen zur Assoziation des Pyrentriglycerides mit Apolipoproteinen und Albumin, die damit zum oben erwähnten Problem führt. Es wird deshalb ein Substrat benötigt, das Fluorophor und Quencher im selben Molekül enthält und bei dem der Quencheffekt nicht oder kaum von der Konformation abhängt. Eine solche Quenchung kann durch ResonanzEnergieTransfer (RET) (das Absorptionsspektrum des Quenchers überlappt mit dem Emissionsspektrum des Fluorophors) erfolgen (Principles of Fluorescence Spectroscopy, J.R. Lakowicz, Plenum Press, 1983). Wichtig dabei ist, daß der Fluorophor und der Quencher an das ω-Ende der hydrophoben Seitenketten gebunden sind, da in diesem Fall keine direkte Interferenz mit der Esterhydrolyse durch das Enzym auftreten kann.

Neben chromogenen Triglyceriden wurden auch Fettsäureester von Fluorophoren (z.B. Methylumbelliferon; Analytic Sciences February 1991, Vol. 7, 15-18) beschrieben, die im intakten Zustand wenig, nach Hydrolysespaltung stärker fluoreszieren (Biochemica et Biophysica Acta, 1006 (1989) 84-88). Allgemein werden hier sehr hohe Mengen an Substrat benötigt, die bei Analysen von nativem biologischen Material zu Artefakten führen können.

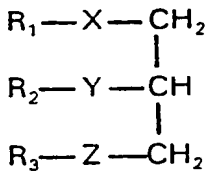
Bei allen bisher bekannten Methoden wird Detergenz für die Solubilisierung des lipophilen Substrates benötigt. Dadurch wird vielfach das native biologische Milieu zerstört (z.B. Solubilisierung von Lipoproteinen und Denaturierung von Proteinen im menschlichen Serum) (Human Serum Lipoproteins, Fruchart & Shepherd, de Gruyter 1989).

Die vorliegende Erfindung beschreibt die chemische Synthese neuer fluorogener Lipasesubstrate (Lipidanaloga). Das optische Meßsignal ist unabhängig von der Konformation des Lipidsubstrats und somit auch von der Substratform. Weiters wird eine neue Substratform für die Solubilisierung des Substrats beschrieben, die universell für die Bestimmung von Lipaseaktivitäten in biologischen und künstlichen Milieus verwendet werden kann.

BNSDOCID: <WO___9532181A1_I_>

Ausführliche Beschreibung:

Die für eine fluorimetrische Messung verwendeten Substanzen sind Verbindungen mit folgender Struktur:



Formel I

Die Verbindungen der angegebenen Struktur können sich von sn-Glycerin ableiten, wobei X, Y, Z gleich O sein kann. Mindestens einer der Reste $R_{1,2,3}$ ist eine Acyl- oder Alkylgruppe, die am ω-Ende einen fluoreszierenden Rest enthält und mindestens ein weiterer Rest $R_{1,2,3}$ ist ein Acyl- bzw. Alkylrest, der am ω-Ende einen Chromophor gebunden enthält und der die Fluoreszenz des Fluorophors über Resonanzenergietransfer (RET) quencht. Mindestens eine der Kohlenwasserstoffketten, die Quencher oder Fluorophor enthalten, müssen über eine Acyl- oder Thioesterbindung vorzugsweise an eine primäre Alkoholfunktion des Glycerins bzw. Propangerüsts gebunden sein. Ein Rest $R_{1,2,3}$ kann ein aliphatischer Kohlenwasserstoff sein. X, Y oder Z können jedoch auch S, NH oder CH_2 sein.

Fluorophor-substituierte Seitenketten $R_{1,2,3}$ können sein:

I. vorzugsweise Pyren gebunden an das ω-Ende einer Acyl- oder Alkylkette mit einer Kettenlänge von C_2 - C_{20} mit 0 bis 6 Doppelbindungen.

II. Anstelle von Pyren kann einer der nachfolgenden Fluorophore eingesetzt werden: Perylen, Anthryl, Anthraniloyl, Saliciloyl, Tetracen, Anthracen, Phenantren, Naphthalen, Cumaron, Cumarin, Acridin, Aminonaphtolsulfonsäure, Phenyloxadiazol, Diphenyloxazol, Alloxazin, Stilben, Dibenzopyron, Fluoren, Fluorenon, p-Quinon, Methylumbelliferon, Trinitrophenylamin, Phenazin, Phenylindol, Quinolin, Diphenylacetylen, Benzothiophen, Cyanothiocarbonyle, 1,3,5,7-Dekatetraen, Rhodamin, Diphenylhexatrien, Dansyl, 7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol (NBD), Benzocarbazon, Dibenzofuran, Parinarsäure, 4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-5-

BNSDOCID: <WO__9532181A1_I_>

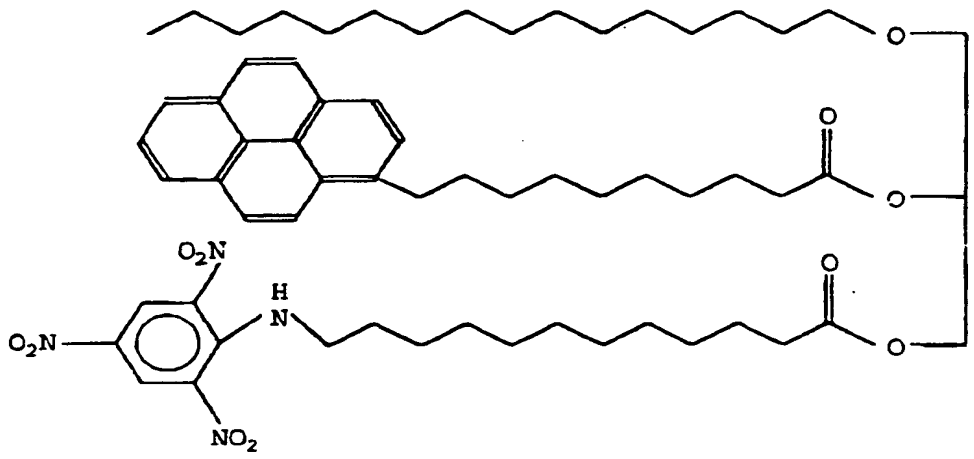
indacen.

Quencher-substituierte Seitenketten $R_{1,2,3}$ können sein:

I. für Pyren als Fluorophor vorzugsweise Trinitrophenylamin gebunden an das ω-Ende einer Acyl- oder Alkylkette mit einer Kettenlänge von C_2 - C_{20} mit 0 bis 6 Doppelbindungen.

II. Anstelle von Trinitrophenylamin können alle chromogenen oder fluorogenen Verbindungen verwendet werden, deren Absorptionsspektrum (Akzeptor) mit dem Emissionsspektrum (Donor) des vermessenen Fluorophors überlappt. Als geeignete Donor-Akzeptor Kombinationen können alle geeigneten Kombinationen von Fluorophoren (siehe oben, II.) verwendet werden.

Als Beispiel für den beschriebenen Verbindungstyp dient das in der nächsten Struktur dargestellte 1-O-Hexadecyl-2-pyrendecanoyl-3-trinitrophenylaminododecanoyl-sn-glycerol.



Formel II

Ausgangsverbindung für das fluorogene Alkyldiacylglycerol ist ein 1-O-Alkylglycerol, das nach bekannten Verfahren (siehe Hermetter & Paltauf) in Etherlipids; Biochemical and Biomedical Aspects (H. Mangold & F. Paltauf, Editors), Academic Press, 1983, p. 389) in ein 1-O-Alkyl-2-acyl-3-O-tritylglycerol umgewandelt wird (Acylierungsvorschrift: F. Paltauf & A. Hermetter, Methods in Enzymology 197 (1991) 134), wobei die 2-Acylgruppe den Fluorophor oder den

BNSDOCID: <WO__9532181A1_I_>

Quencher tragen kann. Nach einem Verfahren, das bereits für die Synthese von Phospholipiden beschrieben ist (Chem. Phys. Lipids, 50 (1989) 57-62), und hier erstmals für die Triglyceridsynthese beschrieben wird, wird die Tritylgruppe durch einen weiteren Acylrest ersetzt, der komplementär zur Position 2 einen Quencher oder Fluorophor trägt. Dieses Verfahren kann auch angewendet werden, um aus substituierten 1,2-Dialkyl-3-O-trityl, 1-Acyl-2-O-alkyl-3-O-trityl und 1,2-Diacyl-3-O-tritylglycerolen die entsprechenden Dialkylacyl und Triacylglycerole herzustellen, wobei eine Seitenkette der Ausgangsverbindung Fluorophor oder Quencher enthält und über den Tritylaustausch ein Acylrest eingeführt wird, der komplementär dazu Quencher oder Fluorophor enthält. Ebenso können nach dieser Methode aus 1-Acyl-2-acylamino-3-O-trityl-1,3-propandiolen durch Tritylgruppenaustausch die entsprechenden 1,3-Diacyl-2-acylamino-propandiole hergestellt werden, die einen Fluorophor- und einen Quencher-substituierten Acylrest enthalten.

Für die fluorimetrische Bestimmung von Lipasen können die neuen Substrate nach allen herkömmlichen Methoden im wäßrigen Milieu (Lipases, Borgström & Brockman (Editors), Elsevier, 1984) und zwar in Phospholipidvesikeln, in Detergensmicellen und Emulsionen verteilt oder in organischen Lösungsmitteln gelöst werden.

Hier wird eine neue Solubilisierungs(Substrat)form beschrieben, wobei das Substrat durch Komplexierung mit einem geeigneten Protein bevorzugt Rinderserum Albumin (BSA) in einem definierten Molverhältnis in der wäßrigen Phase verteilt wird. Hierzu wird eine ethanolische Lösung des Lipidanalogen in eine wäßrige Pufferlösung mit definiertem pH, die bereits BSA enthält, injiziert. Die in dieser Weise erhaltene Substratform (Lipid-Protein-Komplex) kann sowohl in biologischen als auch in künstlichen Milieus verwendet werden. Im besonderen ist hervorzuheben, daß die native Zusammensetzung empfindlicher biologischer Systeme, wie z.B. von menschlichem Serum, nicht zerstört und die Lipaseaktivität dieser Proben in Gegenwart ihrer intakten Bestandteile (Proteine, Lipoproteine!) erfolgen kann. Als Komplexierungsprotein können allgemein lipidbindende Proteine, insbesondere folgende Stoffe verwendet werden: BSA, HSA (Human-

BNSDOCID: <WO___9532181A1_I_>

serum Albumin), Casein, Lactalbumin, Ovalbumin, wasserlösliche Apolipoproteine sowie modifizierte Formen der bereits erwähnten Proteine (methylierte, carboxylierte, acetylierte sowie durch chemische oder genetische Methoden modifizierte Proteine). Untersucht wurden sowohl die fettfreien als auch die im Handel üblichen Proteine (nur teilweise entfettet). Die dargestellten Komplexe stellen Assoziate von Lipid und Protein im Molverhältnis 1/1 dar.

Der wasserlösliche Lipid-Protein-Komplex kann mittels eines Lyophilisators gefriergetrocknet und als festes Pulver isoliert werden. Diese Präparate sind nach Wiederauflösen in wäßrigen Medien für die Vermessung von Lipaseaktivitäten geeignet. Die Lyophilisierung des Lipid-Protein-Komplexes kann in Abwesenheit oder in Gegenwart von Puffer oder Mineralsalzen sowie von nieder- oder hochmolekularen Zusatzstoffen, bevorzugt Kohlehydraten, durchgeführt werden. Bevorzugt erfolgt die Lyophilisierung aus einer Lösung von 10 millimolaren N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)/NaOH (HEPES-NaOH), pH 7,4, und Glykogen oder PBS (2 g KCl, 2 g KH_2PO_4, 80 g NaCl und 21,6 g $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$ in 1 Liter H_2O) und Stärke. Für die Lipasebestimmung kann das Lyophilisat bevorzugt in destilliertem Wasser, wenn die Lyophilisierung aus Puffersalzlösung vorgenommen wurde, oder in wäßriger Pufferlösung, die bevorzugt HEPES-NaOH oder Phosphat oder Tris-HCl, pH 7,4, enthalten, wiederaufgelöst werden.

Zur Herstellung des Komplexes wird die Lösung vom fluorogenen Triglycerid entsprechend Formel I oder II, vorzugsweise in Ethanol, unter Rühren in eine wäßrige Lösung von Protein, vorzugsweise Albumin, die Puffer- oder Mineralsalze enthalten kann, bei Temperaturen, vorzugsweise zwischen 20 und 37°C, injiziert. Das Ethanol-Wasser-Verhältnis ist kleiner als 1/100, v/v. Dieses Präparat kann sofort für eine Lipasebestimmung verwendet werden oder günstigerweise nach einer Equilibrierungsphase von ca. 20 Stunden. Nach Zugabe von Lipase oder eines Lipase-enthaltenden Präparats kann die Aktivität der Lipase über den zeitabhängigen Anstieg der Fluoreszenzintensität kontinuierlich bestimmt werden (Fig. 1). Die in der Probe befindliche(n) Lipase(n) spaltet das Lipidanaloge und führt durch räumliche Trennung von Fluorophor und Quencher

BNSDOCID: <WO___9532181A1_I_>

zu einem vom Ausmaß der Hydrolyse linear abhängigen Anstieg der Fluoreszenz. Die niedrige Ausgangsintensität des Fluorophors im intakten Substrat wird durch die gemeinsame Gegenwart von Fluorophor und Quencher an einem Molekül bewirkt. Dieser Basiswert gilt daher bei jeder Messung als wichtiger Hinweis für die Quenchung des Fluorophors im Substrat und somit für die Qualität und Unversehrtheit der Testsubstanz.

Die Lipasebestimmung kann auch als Endpunktsmethode durchgeführt werden, wobei eine einfache Ablesung des Fluoreszenzintensitätsanstiegs nach definierter Inkubationszeit erfolgt. Die Fluoreszenzmessung selbst kann in kontinuierlicher oder diskontinuierlicher Form mit einem Fluoreszenzspektrometer, Fluoreszenzmikroskop oder Plattenlesegerät durchgeführt werden. Die lipaseinduzierte Spaltung des fluorogenen Substrats kann quantitativ aus dem Anstieg der Fluoreszenzintensität unter Zuhilfenahme einer Eichkurve (Fig. 2), die mittels ungequenchter pyrensubstituierter Triglyceride erstellt wurde, berechnet werden. Der Substratumsatz, der aus dem zeitabhängigen Fluoreszenzanstieg erhalten wird, entspricht der Zunahme der fluoreszierenden Spaltprodukte, die nach erfolgter dünnschichtchromatographischer Auftrennung auf Kieselgel (Laufmittel: Petrolether/Chloroform/Eisessig 96/4/1) und Elution mittels Chloroform/Methanol 2/1 fluorimetrisch bestimmt wurden. Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen Fluoreszenzanstieg und der Menge oder Aktivität von Lipase im Testgemisch (Fig. 3). Diese Linearität wurde allgemein für tierische und mikrobielle Lipasen gefunden. Im besonderen wurden untersucht: Lipoproteinlipase im menschlichen Serum, in der Kuhmilch, in humaner Muttermilch; angereicherte und reine Lipoproteinlipase; Pankreaslipase in Gegenwart und Abwesenheit von Colipase; hepatische Lipase; sowie Lipasen aus *Pseudomonas species, Chromobakterium viscosum, Candida rugosa, Rhizopus arrhizus, Geotrichum candidum.*

Die vorliegende Erfindung kann in folgenden wichtigen Bereichen der Lipaseanalytik praktisch eingesetzt werden.

1) Medizinische Diagnostik: Die Bestimmung von Lipaseaktivität im menschlichen Serum ist wichtig bei der Untersuchung pathologischer Fälle wie Fettstoffwechselstörungen (Hyperlipidämie, Adipositas), sowie auch destruktiven Prozes-

BNSDOCID: <WO___9532181A1_I_>

sen, die zu Organschäden führen, wobei Enzyme in das Serum entlassen werden, die dort entweder gar nicht oder nur in sehr geringer Konzentration vorkommen (z.B. bei Karzinomen oder entzündlichen Prozessen der Leber und des Pankreas, oder Schädigung dieser Organe bei Alkoholismus).

2) Screening von Lipasen in Mikroorganismen und Pflanzen sowie chemisch und gentechnisch modifizierter Enzyme.

3) Stereoisomere der Substanzen der Formeln I und II können für das Screening unterschiedlicher Stereoselektivitäten von natürlichen sowie chemisch und gentechnisch modifizierten Lipasen herangezogen werden. Zum Beispiel wird das sn-1 Acylisomer der Verbindung II von Lipoproteinlipase ca. 25 mal schneller umgesetzt als das sn-3 Acylisomere. Andere Lipasen, die im Serum detektierbar sein können, wie beispielsweise Pankreaslipase, zeigen geringere Stereopräferenzen. Daher kann aus dem Grad der gemessenen Stereopräferenz, der Anteil von Lipoproteinlipase an der Gesamtlipaseaktivität des Serums bestimmt werden.

4) Aktivitätsscreening bei Isolierung und Aufreinigung von natürlichen sowie gentechnisch und biotechnologisch produzierten Lipasen, die nach verschiedenen Methoden wie Säulenchromatographie, HPLC, Gelelektrophorese, Ultrafiltration gereinigt werden. Nach elektrophoretischer Trennung kann die Enzymdetektion direkt auf dem Gel erfolgen.

5) Bestimmung von Lipasen und Lipaseinhibitoren aus Lebensmitteln.

Erfindungsgemäß wird auch ein Kit zur Aktivitätsbestimmung von Lipasen, insbesondere Lipoprotein-, hepatische und pankreatische Lipasen bereitgestellt, umfassend eine Lipase, insbesondere eine Lipoprotein-, hepatische und/oder pankreatische Lipase, als Positivkontrolle und ein oder mehrere Verbindungen nach einem der Ansprüche 1 bis 15 sowie übliche Hilfsstoffe.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung weiter:

Beispiel 1

1-O-Hexadecyl-2-pyrendecanoyl-3-(2',4',6'-trinitrophenylaminododecanoyl)-sn-

BNSDOCID: <WO___9532181A1_I_>

glycerol

1-O-Hexadecyl-sn-glycerol wird mit Tritylchlorid an der sn-3 Position trityliert (siehe Hermetter & Paltauf in Etherlipids; Biochemical and Biomedical Aspects (H. Mangold & F. Paltauf, Editors), Academic Press, 1983, p. 389) und das resultierende Alkyltritylglycerol mit Pyrendecansäure an der noch freien sn-2 OH-Gruppe zum 1-O-Hexadecyl-2-pyrendecanoyl-3-O-trityl-sn-glycerol verestert (Acylierungsvorschrift: F. Paltauf & A. Hermetter, Methods in Enzymology 197 (1991) 134). Eine Lösung des resultierenden 1-O-Hexadecyl-2-pyrendecanoyl-3-O-trityl-sn-glycerols, 150 mg (109,5 µmol), sowie von 280 mg (335 µmol) Trinitrophenylaminododecansäureanhydrid und 500 µl Bortrifluorid-Etherat (50%ig) in 2 ml Methylenchlorid wird eine halbe Stunde bei 0°C und zwei weitere Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird durch Zugabe von $NaHCO_3$ unter Rühren neutralisiert. Die Lösung des Rohprodukts im organischen Lösungsmittel wird abgetrennt und im N_2-Strom auf 1 ml eingeengt. Dann werden 10 ml Petrolether zugegeben. Der Niederschlag wird verworfen und der Überstand auf eine Kieselgelsäule aufgetragen. Elution der Säule mit Petrolether/Essigester 9/1 (v/v) liefert 86,3 mg (79,9 µmol) des Produktes (73% Ausbeute), das dünnschichtchromatographisch auf Kieselgel einheitlich ist.

DC: Rf = 0,79 (Petrolether/Chloroform 1:4)

Beispiel 2

1-(2',4',6'-Trinitrophenylaminododecanoyl)-2-pyrendecanoyl-3-O-hexadecyl-sn-glycerol

Herstellung analog Beispiel 1: aus 3-O-Hexadecyl-sn-glycerol, aus dem zunächst 1-O-Trityl-2-pyrendecanoyl-3-O-hexadecyl-sn-glycerol erhalten wurde. Aus letzterer Verbindung (300 mg, 328,4 µmol) wurde 1-Trinitrophenylaminododecanoyl-2-pyrendecanoyl-3-O-hexadecyl-sn-glycerol (212,7 mg, 197,1 µmol, 60% Ausbeute) nach Säulenchromatographie erhalten.

DC: Rf = 0,79 (Petrolether/Chloroform 1:4)

BNSDOCID: <WO___9532181A1_I_>

Beispiel 3

1-O-Dodecyl-2-pyrendecanoyl-3-(2',4',6'-trinitrophenylaminododecanoyl)-sn-glycerol

Herstellung analog Beispiel 1: aus 100 mg (103,2 µmol) 1-O-Dodecyl-2-pyrendecanoyl-3-O-trityl-sn-glycerol wurden 72,9 mg (71,2 µmol, 69% Ausbeute) 1-O-Dodecyl-2-pyrendecanoyl-3-(2',4',6'-trinitrophenylaminododecanoyl)-sn-glycerol erhalten.

DC: Rf = 0,75 (Petrolether/Chloroform 1:4)

Beispiel 4

1-(2',4',6'-Trinitrophenylaminododecanoyl)-2-pyrendecanoyl-3-O-dodecyl-sn-glycerol

Herstellung analog Beispiel 1: aus 100 mg (103,2 µmol) 1-O-Trityl-2-pyrendecanoyl-3-O-dodecyl-sn-glycerol wurden 63,4 mg (61,9 µmol, 60% Ausbeute) 1-(2',4',6'-Trinitrophenylaminododecanoyl)-2-pyrendecanoyl-3-O-dodecyl-sn-glycerol erhalten.

DC: Rf = 0,75 (Petrolether/Chloroform 1:4)

Beispiel 5

1-O-Tetradecyl-2-O-pyrendecyl-3-(2',4',6'-trinitrophenylaminohexanoyl)-sn-glycerol

1-O-Tetradecyl-sn-glycerol wird mit Tritylchlorid ins 1-O-Tetradecyl-3-O-trityl-sn-glycerol umgewandelt (siehe Hermetter & Paltauf in Etherlipids; Biochemical and Biomedical Aspects (H. Mangold & F. Paltauf, Editors), Academic Press, 1983, p. 389). Alkylierung der letzteren Substanz mit Pyrenhexylmesylat, das aus Pyrenhexanol und Mesylchlorid erhalten wurde (s. Hermetter & Paltauf in Etherlipids; Biochemical and Biomedical Aspects (H. Mangold & F. Paltauf, Editors), Academic Press, 1983, p. 389), liefert 1-O-Tetradecyl-2-O-pyrendecyl-3-O-trityl-sn-glycerol. Das Dialkyltritylglycerol (250 mg, 286,9 µmol) wird mit Trinitrophenylaminohexansäureanhydrid (573,7 mg, 860,7 µmol) in Gegenwart von

BNSDOCID: <WO___9532181A1_I_>

Bortrifluorid-Etherat (50%ig), analog zum Verfahren in Beispiel 1, in das Endprodukt umgewandelt (191,4 mg, 200,8 µmol, 70% Ausbeute).
DC: Rf = 0,85 (Petrolether/Chloroform 1:4)

Beispiel 6

1-(2',4',6'-Trinitrophenylaminohexanoyl)-2-O-pyrendecyl-3-O-tetradecyl-sn-glycerol
Herstellung analog Beispiel 5: aus 200 mg (229,5 µmol) 1-O-Trityl-2-O-pyrendecyl-3-O-tetradecyl-sn-glycerol wurden 148,8 mg (156,1 µmol, 68% Ausbeute) 1-Trinitrophenylaminohexanoyl-2-O-pyrendecyl-3-O-tetradecyl-sn-glycerol erhalten.
DC: Rf = 0,85 (Petrolether/Chloroform 1:4)

Beispiel 7

rac.1-Oleoyl-2-pyrendodecanoyl-3-(2',4',6'-trinitrophenylaminododecanoyl)-glycerol
Analog zum Verfahren in Beispiel 1 wird aus rac.1-Oleoyl-glycerol rac.1-Oleoyl-3-O-trityl-glycerol hergestellt, das mit Pyrendodecansäureanhydrid in rac.1-Oleoyl-2-pyrendodecanoyl-3-O-tritylglycerol umgewandelt wird. Der Umsatz des Diacyltritylglycerols (200 mg, 209,8 µmol) mit Trinitrophenylaminododecansäureanhydrid (525,5 mg, 629,4 µmol) in Gegenwart von Bortrifluorid-Etherat (50%ig), liefert rac.1-Oleoyl-2-pyrendodecanoyl-3-(2',4',6'-trinitrophenylaminododecanoyl)-glycerol (122,1 mg, 109,1 µmol, 52% Ausbeute).
DC: Rf = 0,75 (Petrolether/Chloroform 1:4)

Beispiel 8

1-(2',4',6'-Trinitrophenylaminododecanoyl)-2-pyrendodecanoyl-3-oleoyl-sn-glycerol
Analog zum Verfahren in Beispiel 7 wird 3-Oleoyl-sn-glycerol zunächst über das Oleoyltrityl-sn-glycerol in 1-O-Trityl-2-pyrendodecanoyl-3-oleoyl-sn-glycerol

BNSDOCID: <WO__9532181A1_I_>

umgewandelt, das mit Trinitrophenylaminododecansäureanhydrid in Gegenwart von Bortrifluorid-Etherat das Endprodukt (50% Ausbeute) gibt.
DC: Rf = 0,75 (Petrolether/Chloroform 1:4)

Beispiel 9

1-Oleoyl-2-pyrendodecanoyl-3-(2',4',6'-trinitrophenylaminododecanoyl)-sn-glycerol
Analog zum Verfahren in Beispiel 8 wird 1-Oleoyl-2-pyrendodecanoyl-3-O-trityl-sn-glycerol in das Endprodukt umgewandelt (Ausbeute 56%).
DC: Rf = 0,75 (Petrolether/Chloroform 1:4)

Beispiel 10

rac.1-Pyrendecanoyl-2-O-hexadecyl-3-(2',4',6'-trinitrophenylaminododecanoyl)-glycerol
2-O-Hexadecylglycerol (siehe Hermetter & Paltauf in Etherlipids; Biochemical and Biomedical and Biomedical Aspects (H. Mangold & F. Paltauf, Editors), Academic Press, 1983, p. 389) (100 mg 315 µmol) wurde mit Pyrendecansäure in Gegenwart von Dimethylaminopyridin (85,5 mg, 100 µmol) und Dicyclohexylcarbodiimid (75 mg, 350 µmol) in 5 ml $CHCl_3$ acyliert (Acylierungsvorschrift: F. Paltauf & A. Hermetter, Methods in Enzymology 197 (1991) 134). Das gebildete rac.1-Pyrendecanoyl-2-O-hexadecyl-glycerol wurde an Kieselgel chromatographiert (Elution mit einem Gradienten von Petrolether-Ether). Das Reinprodukt wurde in 87% Ausbeute (146 mg) erhalten; DC an Kieselgel: Rf = 0,40 (Chloroform/Azeton/Eisessig 96:4:1). Das Acylalkylglycerol (146 mg, 188 µmol) wurde hierauf mit Trinitrophenylaminododecansäure (100 mg, 230 µmol) in Gegenwart von 52 mg Dimethylaminopyridin (423 µmol) und 42 mg Dicyclohexylcarbodiimid (200 µmol) in 5 ml Chloroform acyliert. Das gebildete rac.1-Pyrendecanoyl-2-O-hexadecyl-3-(2',4',6'-trinitrophenylaminododecanoyl)-glycerol wurde an Kieselgel (Elution mit einem Gradienten von Petrolether-Ether (Kieselgel, Chloroform/Azeton/Eisessig 96:4:1) gereinigt (137 mg, 68% Ausbeute).
DC: Rf = 0,80

BNSDOCID: <WO__9532181A1_I_>

Beispiel 11

rac.1-Tetradecanoylamino-2-pyrendecanoyl-3-(2',4',6'-trinitrophenylaminododecanoyl)-propandiol

Die Synthese geht aus von rac.1-Tetradecanoylamino-3-O-tritylpropandiol, das nach Literaturvorschrift hergestellt wurde (R. Dijkman, N. Dekker, and G.H. Haas, Biochim.Biophys.Acta 1043 (1990) 67-74). Das Acyltritylpropandiol wurde mit Pyrendecansäure zum rac.1-Tetradecanoylamino-2-pyrendecanoyl-3-O-tritylpropandiol verestert (Es wurde die gleiche Methode wir für die Acylierung von Alkyltritylglycerolen verwendet, siehe Hermetter & Paltauf in Etherlipids; Biochemical and Biomedical Aspects (H. Mangold & F. Paltauf, Editors), Academic Press, 1983, p. 389. Aus dieser Verbindung (200 mg, 286,5 µmol) wurden durch Tritylgruppenaustausch mit Trinitrophenylaminododecansäureanhydrid, analog zu dem unter Beispiel 1 angegebenen Verfahren, 153,3 mg (177,6 µmol, 62% Ausbeute) des Endprodukts erhalten.

DC: Rf = 0,70 (Petrolether/Chloroform 1:4)

Beispiel 12

In eine Lösung von 9 nmol (0,6 mg) Rinderserumalbumin (BSA) in 9 ml 10 mM Tris/HCl, pH 7,4 wird unter Rühren mittels einer Hamiltonspritze in einem möglichst dünnen Strahl eine Lösung von 9 nmol (9 µg) 1-O-Hexadecyl-2-pyrendecanoyl-3-(2',4',6'-trinitrophenylaminododecanoyl)-sn-glycerol (Beispiel 1) in 30 µl Ethanol bei Raumtemperatur eingespritzt. 3 ml einer derart erhaltenen Lösung eines BSA-Triglycerid-Komplexes werden mit 40 µl Lipaseprobe (Lipoproteinlipase) versetzt. Hierauf wird über den zeitabhängigen Anstieg der Fluoreszenz bei 380 nm die Reaktion mit einem Fluorimeter bei 37°C verfolgt (Anregung 342 nm; Spaltbreite: Anregung 10 nm Emission 10 nm). Die Lipaseaktivität der Probe in pmol umgesetztes Substrat/Testvolumen/Zeiteinheit (hier 2,1 pmol/ml/min) wird aus der Steigung des Fluoreszenzanstiegs (Fig. 1) und über eine Eichgerade (Fig. 2) ermittelt, welche für bekannte Konzentrationen von Hexadecylpyrendecanoyltritylglycerol (HPTG) in wäßriger Albuminlösung erhalten wurde. Die ermittelten Lipaseaktivitäten stehen in linearem Zusammenhang mit der einge-

BNSDOCID: <WO__9532181A1_I_>

setzten Enzymmenge (in µg) (Fig. 3).

Beispiel 13

Wie unter Beispiel 12 beschrieben, wurde die Aktivität von 1 µg Lipoproteinlipase (aus Kuhmilch) an einem Albumin-Substrat-Komplex aus BSA und 1-(2',4',6'-Trinitrophenylaminododecanoyl)-2-pyrendecanoyl-3-O-hexadecyl-sn-glycerol (Beispiel 2) zu 52,3 pmol/ml/min bestimmt.

Beispiel 14

Wie unter Beispiel 12 beschrieben, wurde die Aktivität von 1 µg Lipoproteinlipase (aus Kuhmilch) an einem Albumin-Triglycerid-Komplex aus BSA und 1-O-Dodecyl-2-pyrendecanoyl-3-(2',4',6'-trinitrophenylaminododecanoyl)-sn-glycerol (Beispiel 3) zu 6 pmol/ml/min bestimmt.

Beispiel 15

Wie unter Beispiel 12 beschrieben, wurde die Aktivität von 1 µg Lipoproteinlipase (aus Kuhmilch) an einem Albumin-Triglycerid-Komplex aus BSA und 1-(2',4',6'-Trinitrophenylaminododecanoyl)-2-pyrendecanoyl-3-O-dodecyl-sn-glycerol (Beispiel 4) zu 150 pmol/ml/min bestimmt.

Beispiel 16

Die Verwendung verschiedener Komplexierungsproteine für fluorogene Substrate der Lipoproteinlipase lieferte die in der Tabelle 1 zusammengestellten Ergebnisse. Ein Komplex aus Protein und 1-O-Hexadecyl-2-pyrendecanoyl-3-(2',4',6'-trinitrophenylaminododecanoyl)-sn-glycerol wurde gemäß Beispiel 12 hergestellt, wobei die in der Tabelle angeführten Proteine eingesetzt wurden.
Die angeführten Proteine wurden gekauft (BSA: Boehringer Mannheim GmbH; die restlichen von Sigma).
Die Lipoproteinlipaseaktivität wurde nach der unter Beispiel 12 angeführten

BNSDOCID: <WO___9532181A1_I_>

Vorschrift ermittelt.

Tabelle 1

Protein	Aktivität [pmol/ml/min]
BSA (Rinderserumalbumin)	18
BSA-palmitoyliert	8
BSA-acetyliert	13
HSA (Humanserumalbumin)	13
Ovalbumin	4
Casein	5
Lactalbumin	13
Globulin	1,3

Beispiel 17

Für verschiedene Lipasen wurden an einem Komplex aus 1-O-Dodecyl-2-pyrendecanoyl-3-(2',4',6'-trinitrophenylaminododecanoyl)-sn-glycerol und BSA Aktivitäten gemessen, die linear von der Enzymkonzentration abhängig waren. Bereitung des Komplexes, Aktivitätsmessung sowie Auswertung erfolgten wie unter Beispiel 12 beschrieben. Mit Esterase aus Schweineleber und Phospholipase A_2 aus Schweinepankreas (beide von Boehringer Mannheim) wurden keine Aktivitäten gefunden.

Folgende Lipasen zeigten deutliche Aktivitäten: Schweinepankreaslipase (PL) (von Boehringer Mannheim GmbH), Lipoproteinlipase (LPL) aus Humanserum und Kuhmilch, sowie menschliches Serum und Muttermilch; mikrobielle Lipasen aus: *Chromobakterium viscosum, Candida rugosa, Rhizopus arrhizus, Pseudomonas species* (von Nagase Biochemicals, Ltd., Japan), *Geotrichum candidum*.

BNSDOCID: <WO___9532181A1_I_>

Beispiel 18

Bestimmt wurde der Einfluß von Salzen und Detergentien auf die Lipaseaktivität von Lipoproteinlipase.

Verwendeter Komplex: Herstellung und Zusammensetzung wie unter Beispiel 17 beschrieben.

Verwendete Lipoproteinlipase: LPL aus Kuhmilch.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 2 zusammengestellt:

Tabelle 2

Additive	Aktivität [pmol/ml/min]
ohne	18
0,1 M NaCl	26
10 mM $CaCl_2$	30
20 mM Triton	22
10 mM $CaCl_2$ + 20 mM Triton	40

Beispiel 19

Wie unter Beispiel 13 beschrieben, wurden die Aktivitäten von jeweils 20 µl menschlichen Plasmas vor und nach Heparinisierung eines normolipämischen Spenders (60 U/kg Körpergewicht, Blutabnahme nach 25 min) durchgeführt.

Serumlipaseaktivität vor Heparinisierung: gering bis keine Aktivität

Serumlipaseaktivität vor Heparinisierung: 60 pmol/ml/min

Beispiel 20

Der unter Beispiel 12 in wäßrigem Medium erhaltene Komplex aus fluorogenem Substrat und Rinderserumalbumin wird bei -75°C eingefroren und anschließend

BNSDOCID: <WO__9532181A1_I_>

lyophilisiert.

Beispiel 21

Wie unter Beispiel 20 beschrieben, wurde ein Lyophilisat aus Albumin und fluorogenem Substrat hergestellt, wobei als wäßriges Medium eine Lösung von 25 mg Glykogen in 3 ml 10 mM HEPES, pH 7,4 (pH-Einstellung mit NaOH), verwendet wurde.

Beispiel 22

Wie unter Beispiel 20 beschrieben, wurde ein Lyophilisat aus Albumin und fluorogenem Substrat hergestellt, wobei als wäßriges Medium eine Lösung von 25 mg Saccharose in 3 ml 10 mM Na-Phosphatpuffer, pH 7,4, verwendet wurde.

Beispiel 23

Wie unter Beispiel 20 beschrieben, wurde ein Lyophilisat aus Albumin und fluorogenem Substrat hergestellt, wobei als wäßriges Medium eine Lösung von 25 mg Stärke in 3 ml PBS (2 g KCl, 2 g KH_2PO_4, 80 g NaCl und 21,6 g $NA_2HPO_4{\cdot}H_2O$ in 1 Liter H_2O), pH 7,4, verwendet wurde.

Beispiel 24

Die unter Beispiel 20-23 hergestellten Lyophilisate wurden in 9 ml $H_2O_{dest.}$ gelöst. Jeweils 3 ml Aliquots wurde für die Aktivitätsbestimmung von LPL wie unter Beispiel 11 beschrieben, verwendet. Die Resultate können der Tabelle 3 entnommen werden:

BNSDOCID: <WO__9532181A1_I_>

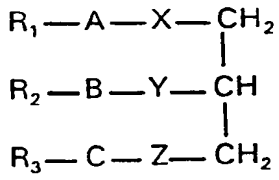
Tabelle 3

Lyophilisat	Aktivität (pmol/ml/min)
aus Tris/HCl	7
aus HEPES + Glykogen	12
aus Phosphatpuffer + Saccharose	10
aus PBS + Stärke	13

BNSDOCID: <WO___9532181A1_I_>

Patentansprüche

1. Racemate und Enantiomere der allgemeinen Formel



worin R_1, R_2 und R_3 Alkyl- oder Alkenylketten mit 2 bis 26 C-Atomen, wobei die Anzahl der Doppelbindungen 0 - 6 betragen kann, X, Y und Z -S-, -O-, -NH- oder auch $-CH_2-$, A, B, C,

O

-C- oder $-CH_2-$ bedeuten, dadurch gekennzeichnet, daß jeweils eine der Seitenketten R_1, R_2 und R_3 einen Fluorophor als molekularen optischen Sensor und ein anderer Rest R_1, R_2 und R_3 einen Quencher enthält, wobei alle chromogenen und fluorogenen Substituenten Quencher sein können, deren Absorptionsspektrum mit dem Emissionsspektrum des Fluorophors, der als molekularer optischer Sensor verwendet wird überlappt, und die somit als Resonanzenergietransfer (RET)-Akzeptoren für den Sensor-Fluorophor (RET-Donor) in Frage kommen.

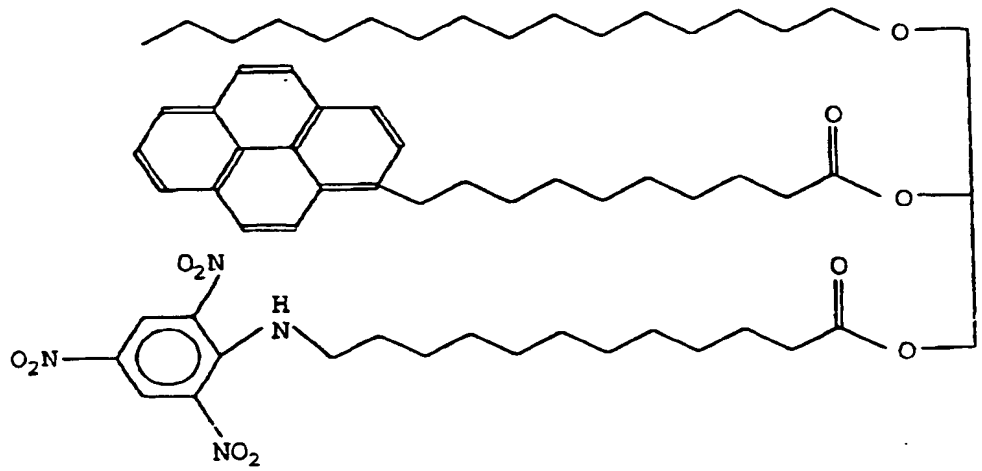
2. Verbindungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als fluoreszierende Gruppen Pyren, Perylen, Anthryl, Anthraniloyl, Saliciloyl, Tetracen, Anthracen, Phenantren, Naphthalen, Cumaron, Cumarin, Acridin, Aminonaphtolsulfonsäure, Phenyloxadiazol, Diphenyloxazol, Alloxazin, Stilben, Dibenzopyron, Fluoren, Fluorenon, p-Quinon, Methylumbelliferon, Trinitrophenylamin, Phenazin, Phenylindol, Quinolin, Diphenylacetylen, Benzothiophen, Cyanothiocarbonyle, 1,3,5,7-Dekatetraen, Rhodamin, Diphenylhexatrien, Dansyl, 7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol (NBD), Benzocarbazon, Dibenzofuran, Parinarsäure, 4,4-Difluoro-4-bora-3a-4a-diaza-5-indacen verwendet werden.

BNSDOCID: <WO__9532181A1_I_>

3. Verbindungen nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß als quenchende Gruppen Trinitrophenylamin oder Pyren, Perylen, Anthryl, Anthraniloyl, Saliciloyl, Tetracen, Anthracen, Phenantren, Naphthalen, Cumaron, Cumarin, Acridin, Aminonaphtholsulfonsäure, Phenyloxadiazol, Diphenyloxazol, Alloxazin, Stilben, Dibenzopyron, Fluoren, Fluorenon, p-Quinon, Methylumbelliferon, Phenazin, Phenylindol, Quinolin, Diphenylacetylen, Benzothiophen, Cyanothiocarbonyle, 1,3,5,7-Dekatetraen, Rhodamin, Diphenylhexatrien, Dansyl, 7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol (NBD), Benzocarbazon, Dibenzofuran, Parinarsäure, 4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-5-indacen verwendet werden, wobei deren Absorptionsspektren den Bedingungen von Anspruch 1 entsprechen müssen.

4. Racemat und Enantiomere von O-Alkyl-diacyl-glycerolen, Di-O-alkyl-acyl-glycerolen und Triacylglycerolen nach Anspruch 1, 2 und 3.

5. Racemat und Enantiomere der Verbindung nach Anspruch 1, 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Formel



hat.

6. 1-O-Dodecyl-2-pyrendecanoyl-3-(2',4',6'-trinitrophenylaminododecanoyl)-sn-glycerol.

BNSDOCID: <WO___9532181A1_I_>

7. 1-(2',4',6'-Trinitrophenylaminododecanoyl)-2-pyrendecanoyl-3-O-dodecyl-sn-glycerol.

8. 1-O-Tetradecyl-2-O-pyrendecyl-3-(2',4',6'-trinitrophenylaminohexanoyl)-sn-glycerol.

9. 1-(2',4',6'-Trinitropheylaminohexanoyl)-2-O-pyrendecyl-3-O-tetradecyl-sn-glycerol.

10. rac.1-Oleoyl-2-pyrendodecanoyl-3-(2',4',6'-trinitrophenylaminododecanoyl)-glycerol.

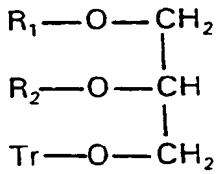
11. 1-(2',4',6'-Trinitrophenylaminododecanoyl)-2-pyrendodecanoyl-3-oleoyl-sn-glycerol.

12. 1-Oleoyl-2-pyrendodecanoyl-3-(2',4',6'-trinitrophenylaminododecanoyl)-sn-glycerol.

13. rac.1-Pyrendecanoyl-2-O-hexadecyl-3-(2',4',6'-trinitrophenylaminododecanoyl)-glycerol.

14. rac.1-Tetradecanoylamino-2-pyrendecanoyl-3-(2',4',6'-trinitrophenylaminododecanoyl)-propandiol.

15. Racemate und Enantiomere von Alkylacyl-, Dialkyl- und Diacyltrityl-glycerolen nach den Ansprüchen 1, 2, 3 und 4, die die Formel



Tr = Trityl (Triphenylmethyl)

BNSDOCID: <WO__9532181A1_I_>

haben, dadurch gekennzeichnet, daß ein Radylrest R_1 oder R_2 einen Fluorophor und ein anderer Radylrest R_2 oder R_1 einen Quencher kovalent gebunden enthält.

16. Verfahren zur Herstellung von Triacyl-, Alkyldiacyl- und Dialkylacylglycerolen, dadurch gekennzeichnet, daß in den entsprechenden Alkylacyltritylglycerolen, Dialkyltritylglycerolen oder Diacyltritylglycerolen die Tritylgruppe durch eine Acylgruppe in Gegenwart von Bortrifluorid-Etherat als Katalysator in einer Einstufenreaktion ersetzt wird.

17. Verfahren zur Herstellung der neuen enantiomeren Triglyceridanalogen 1-O-Hexadecyl-2-pyrendecanoyl-3-trinitrophenylaminododecanoyl-sn-glycerol, 1-O-Hexadecyl-2-pyrendecyl-3-trinitrophenylaminododecanoyl-sn-glycerolund 1-O-Hexadecanoyl-2-pyrendecanoyl-3-trinitrophenylaminododecanoyl-sn-glycerol, dadurch gekennzeichnet, daß in den entsprechenden Alkylacyltritylglycerolen, Dialkyltritylglycerolen oder Diacyltritylglycerolen die Tritylgruppe durch eine Acylgruppe in Gegenwart von Bortrifluorid-Etherat als Katalysator in einer Einstufenreaktion ersetzt wird.

18. Wasserlösliche Komplexe fluorogener Verbindungen nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß das fluoreszierende Lipid mit wasserlöslichen lipidbindenden Proteinen, bevorzugt mit Rinderserumalbumin, Humanserumalbumin, Ovalbumin, Lactalbumin, Casein, Apolipoproteinen, oder durch Acylierung, Alkylierung, Hydroxymethylierung, Carboxymethylierung oder Carboxylierung modifizierten Proteinen in wäßriger Lösung solubilisiert ist.

19. Lyophilisate von wasserlöslichen Lipid-Protein-Komplexen nach Anspruch 18.

20. Wasserlösliche Komplexe der enantiomeren Triglyceridanaloga 1-O-Hexadecyl-2-pyrendecanoyl-3-trinitrophenylamino-dodecanoyl-sn-glycerol, 1-O-Hexadecyl-2-pyrendecyl-3-trinitrophenylaminododecanoyl-sn-glycerol

BNSDOCID: <WO___9532181A1_I_>

und 1-O-Hexadecanoyl-2-pyrendecanoyl-3-trinitrophenylaminododecanoyl-sn-glycerol, dadurch gekennzeichnet, daß diese Lipide mit wasserlöslichen lipidbindenden Proteinen, bevorzugt mit Rinderserumalbumin, Humanserumalbumin, Ovalbumin, Lactalbumin, Casein, Apolipoproteinen, oder durch Acylierung, Alkylierung, Hydroxymethylierung, Carboxymethylierung oder Carboxylierung modifizierten Proteinen in wäßriger Lösung solubilisiert sind.

21. Lyophilisate von wasserlöslichen Lipid-Protein-Komplexen nach Anspruch 20.

22. Lyophilisate nach den Ansprüchen 19 und 21, die in Gegenwart von Zusätzen, bevorzugt Stärke, Glykogen organischen und anorganischen Salzen, Saccharose hergestellt werden.

23. Fluorimetrische Bestimmung von Lipaseaktivitäten, gekennzeichnet dadurch, daß man Komplexe der fluorogenen Substrate mit wasserlöslichen Proteinen nach den Ansprüchen 18 und 20 oder Lösungen der Lyophilisate nach den Ansprüchen 19 und 21 in wäßriger Pufferlösung einem fettspaltenden Enzym anbietet und die Enzymaktivität über die Veränderung eines Fluoreszenzparameters, bevorzugt über den Anstieg der Fluoreszenzintensität des Sensor-Fluorophors bestimmt.

24. Fluorimetrische Bestimmung von Lipaseaktivitäten, gekennzeichnet dadurch, daß Verbindungen nach einem der Ansprüche 1 bis 15 solubilisiert in Phospholipid-Liposomen, Vesikeln, Detergens-Micellen oder Emulsionen, Lösungen in organischen Lösungsmitteln oder Gemischen organischer Lösungsmittel mit Wasser der Lipase anbietet und die Enzymaktivität über die Veränderung eines Fluoreszenzparameters, bevorzugt über den Anstieg der Fluoreszenzintensität des Sensor-Fluorophors bestimmt.

25. Verwendung der Bestimmungsmethoden nach Anspruch 23 oder 24 in der medizinischen Diagnostik zur klinischen Lipaseanalytik bevorzugt im

BNSDOCID: <WO___9532181A1_I_>

menschlichen Serum, Plasma und Fettgewebe nach oder ohne Heparinisierung des Spenders, bei pathologischen Erscheinungsformen wie Karzinom, Adipositas, Hyperlipidämie, Alkoholismus, Hepatitis, Pankreatitis sowie bei gesunden Spendern, zur Lipaseanalytik bei der biotechnologischen Lipaseproduktion, für das Screening von Lipasen aus tierischen, pflanzlichen und mikrobiellen Material, sowie chemisch und gentechnologisch modifizierter oder produzierter Lipasen, als auch bei ernährungswissenschaftlichen und lebensmittelchemischen Untersuchungen, bevorzugt für das Screening von Lipasen und Lipaseinhibitoren.

26. Verfahren zum Screening der Stereospezifität von Lipasen, dadurch gekennzeichnet, daß man die Aktivität der Lipasen an beiden Enantiomeren der fluorogenen Verbindungen nach einem der Ansprüche 1 bis 15 mit einem Verfahren nach Anspruch 22 oder 23 bestimmt.

27. Kit zur Aktivitätsbestimmung von Lipasen, insbesondere Lipoprotein-, hepatische und pankreatische Lipasen, umfassend eine Lipase, insbesondere eine Lipoprotein-, hepatische und/oder pankreatische Lipase, als Positivkontrolle und ein oder mehrere Verbindungen nach einem der Ansprüche 1 bis 15 sowie übliche Hilfsstoffe.

BNSDOCID: <WO__9532181A1_I_>

Fig. 1

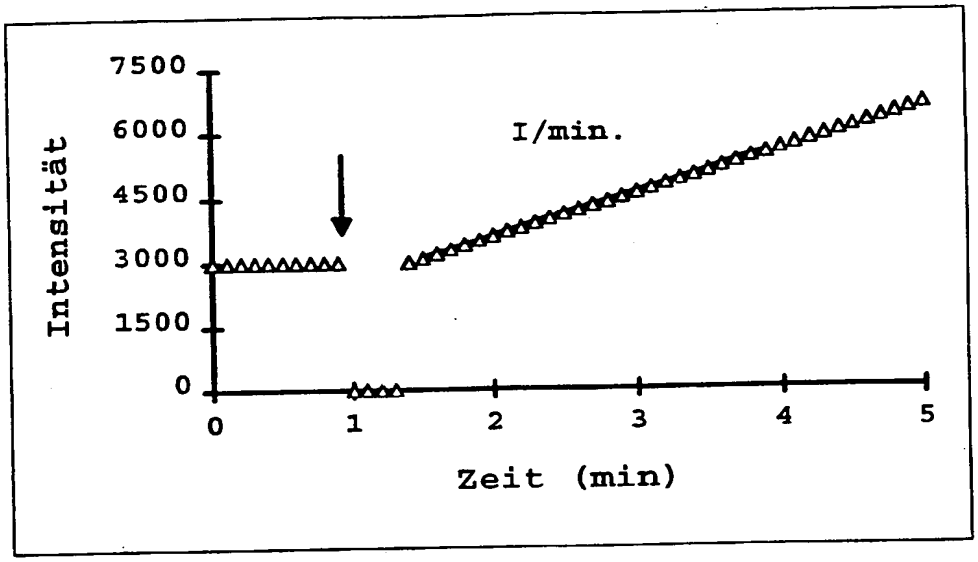
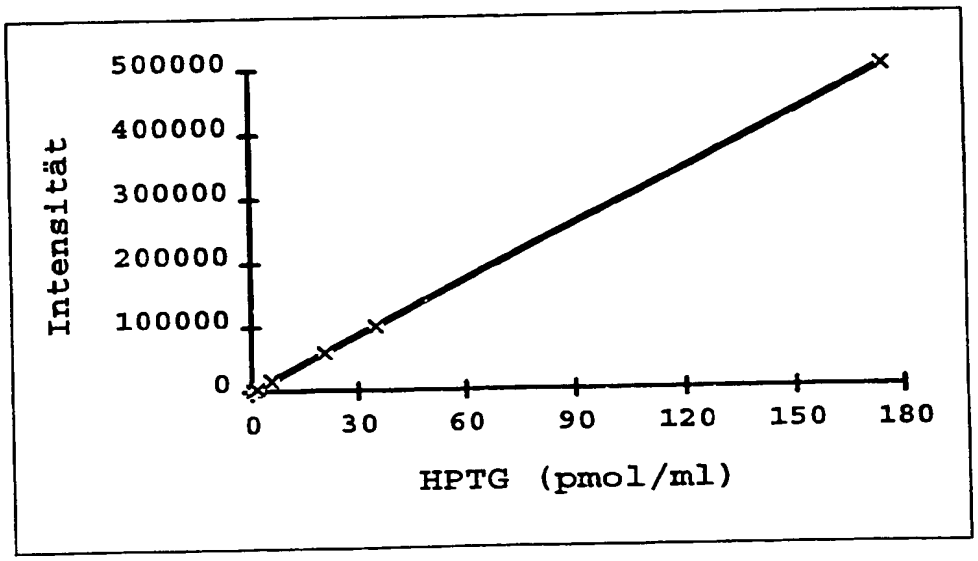
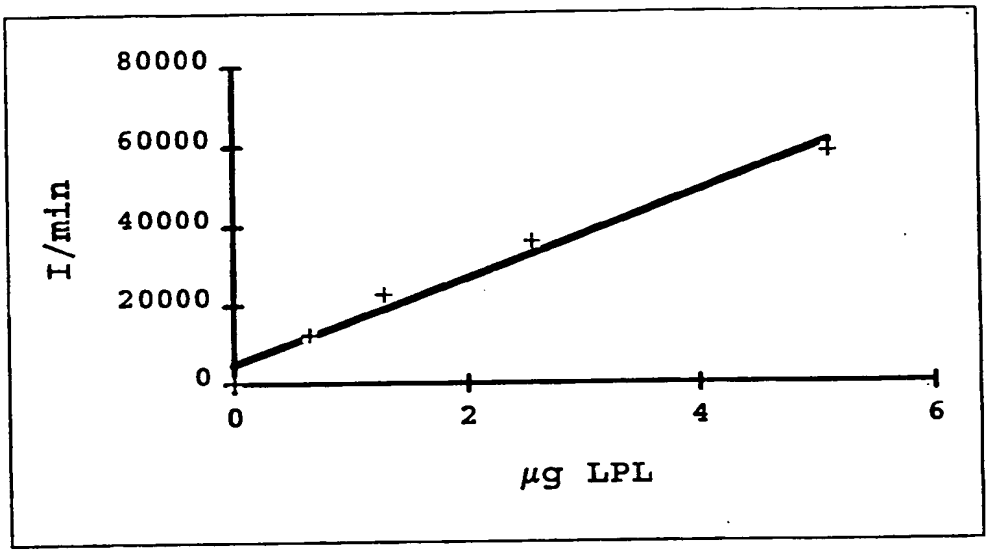


Fig. 2



BNSDOCID: <WO___9532181A1_I_>

Fig. 3



BNSDOCID: <WO___9532181A1_I_>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter nal Application No
PCT/EP 95/01919

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C07C229/18 C12Q1/44

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C07C C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP,A,0 037 583 (KSV CHEMICALS OY) 14 October 1981 cited in the application see page 2, line 22 - page 4, line 1 see page 4, line 28 - line 32 see page 8, line 19 - line 33; claims 1,2; examples 2,4 --- -/--	1-14, 23-27

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
30 August 1995	-5. 09. 95

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+ 31-70) 340-3016	Seufert, G

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

BNSDOCID: <WO___9532181A1_I_>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter ıal Application No
PCT/EP 95/01919

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol.170, no.1, 1988 pages 248 - 255 T. THUREN ET AL. 'Phospholipase A2 assay using an intramolecularly quenched pyrene-labeled phospholipid analog as a substrate' see page 249, left column, line 22 - line 45 see page 253, left column, line 16 - right column, line 3 see page 253, right column, line 13 - line 22	1-14, 23-27
A	CHEMISTRY AND PHYSICS OF LIPIDS, vol.59, 1991 pages 69 - 74 T. THUREN, P. J. KINNUNEN 'A continuous fluorometric assay for phospholipase C from Clostridium perfringens' see page 69, right column, line 8 - page 70, left column, line 7	1-27
A	BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol.963, 1988 pages 340 - 348 A. NEGRE ET AL. 'Hydrolysis of fluorescent pyrenetriacylglycerols by lipase from human stomach and gastric juice' cited in the application see the whole document	1-27
P,A	JOURNAL OF FLUORESCENCE, vol.4, no.4, 1994 pages 365 - 366 E. GRUND ET AL. 'Conformational effects on the fluorescence of pyrene-labeled alkyldiacyl glycerols in different model membranes'	1-27

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

BNSDOCID: <WO___9532181A1_I_>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Inter nal Application No
PCT/EP 95/01919

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A-0037583	14-10-81	AT-T-	10112	15-11-84
		CA-A-	1154453	27-09-83
		JP-A-	56164795	17-12-81
		US-A-	4668623	26-05-87

BNSDOCID: <WO___9532181A1_I_>

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 95/01919

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C07C229/18 C12Q1/44

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C07C C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP,A,0 037 583 (KSV CHEMICALS OY) 14. Oktober 1981 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 2, Zeile 22 - Seite 4, Zeile 1 siehe Seite 4, Zeile 28 - Zeile 32 siehe Seite 8, Zeile 19 - Zeile 33; Ansprüche 1,2; Beispiele 2,4 --- -/--	1-14, 23-27

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

1

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
30. August 1995	05.09.95

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+ 31-70) 340-3016	Seufert, G

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

BNSDOCID: <WO___9532181A1_I_>

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, Bd.170, Nr.1, 1988 Seiten 248 - 255 T. THUREN ET AL. 'Phospholipase A2 assay using an intramolecularly quenched pyrene-labeled phospholipid analog as a substrate' siehe Seite 249, linke Spalte, Zeile 22 - Zeile 45 siehe Seite 253, linke Spalte, Zeile 16 - rechte Spalte, Zeile 3 siehe Seite 253, rechte Spalte, Zeile 13 - Zeile 22 ---	1-14, 23-27
A	CHEMISTRY AND PHYSICS OF LIPIDS, Bd.59, 1991 Seiten 69 - 74 T. THUREN, P. J. KINNUNEN 'A continuous fluorometric assay for phospholipase C from Clostridium perfringens' siehe Seite 69, rechte Spalte, Zeile 8 - Seite 70, linke Spalte, Zeile 7 ---	1-27
A	BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, Bd.963, 1988 Seiten 340 - 348 A. NEGRE ET AL. 'Hydrolysis of fluorescent pyrenetriacylglycerols by lipase from human stomach and gastric juice' in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-27
P,A	JOURNAL OF FLUORESCENCE, Bd.4, Nr.4, 1994 Seiten 365 - 366 E. GRUND ET AL. 'Conformational effects on the fluorescence of pyrene-labeled alkyldiacyl glycerols in different model membranes' -----	1-27

BNSDOCID: <WO___9532181A1_I_>

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Inte. nales Aktenzeichen
PCT/EP 95/01919

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP-A-0037583	14-10-81	AT-T-	10112	15-11-84
		CA-A-	1154453	27-09-83
		JP-A-	56164795	17-12-81
		US-A-	4668623	26-05-87

BNSDOCID: <WO___9532181A1_I_>